

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/054497 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61P 35/00, A61K 45/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004233

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2003 (16.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 59 619.0 18. Dezember 2002 (18.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): METAGEN PHARMACEUTICALS GMBH (DE/DE); Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PLATH, Thomas (DE/DE); Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). REULE, Matthias (DE/DE); Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). KAISER, Simone (DE/DE); Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). LICHTNER, Rosemarie (DE/DE); Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). HEIDEN CONSTANIOS-VELEZ, Esmeralda (ES/DE); Tauroggenner Strasse 8, 10589 Berlin (DE).

(74) Anwalt: JUNGBLUT, Bernhard; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelferstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. Dezember 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A TRPM8-ACTIVATING SUBSTANCE FOR THE TREATMENT OF TUMOURS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER TRPM8 AKTIVIERENDEN SUBSTANZ ZUR TUMORBEHANDLUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of a TRPM8-activating substance for producing a pharmaceutical composition for the treatment of tumour diseases in which TRPM8 is over-expressed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/054497 A3

Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von TRPM8 modulierenden Substanzen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die
10 Erfindung betrifft desweiteren solche Zusammensetzungen, sowie einen Behandlungsplan.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

15

Folgend werden die Bezeichnungen Trpp8 und TRPM8 synonym verwendet.

Die Kalzium Homeostase regelt wichtige Zellfunktionen, wie
20 Proliferation, Differenzierung, Invasion, Migration, Angiogenese und Apoptose. Bei Prostatakrebs spielt Kalzium eine wichtige Rolle in der Tumorbildung. Es ist jedoch wenig über die Kalziumkanäle und membrangebundenen Plasma Rezeptoren bekannt, die den Eintritt und Austritt von Kal-
25 zium in und aus intrazellulären Kalziumreservoirs in Prostatatumorzellen regeln.

Trpp8 ist in der Literaturstelle Tsavaler et al., Cancer Res, 61:3760-3769 (2001) als Prostata-spezifisches Gen
30 beschrieben worden, welches vorwiegend in humanen Prostatatumoren exprimiert wird. Trpp8 wird signifikant hochreguliert. In Androgen-abhängigen Prostata Zelllinien wird gemäß dieser Literaturstelle Trpp8 gefunden, nicht jedoch

in Androgen-unabhängigen Zelllinien, welche auch nicht PAP (prostate acid phosphatase) und PSA (prostate specific antigen) exprimieren. Es wird vermutet, daß Trpp8 als Kalzium Kanal Protein funktioniert.

5

Trp Proteine sollen zu den sogenannten store operated calcium channels (SOC) bzw. capacitative calcium entry channels (CCE) gehören. In LNCaP Zellen konnte eine Involvierung in der Apoptose gezeigt werden (Wertz et al., J Biol Chem, 275:11470-11477 (2000)).

Die 5694 bp Trpp8 cDNA hat einen 3312 bp offenen Leserahmen, welcher für ein 1104 Aminosäuren Protein mit angeblich sieben transmembranen Domänen codiert mit einem Molekulargewicht von ca. 127.500 Da.

Trpp8 Sequenzen sind in den Literaturstellen US-6,194,152, US-6,183,968, WO-99/46374, WO-99/09166, WO-01/25273, WO-01/25272, WO-01/34802, WO-01/46258, WO-01/42467 und WO-01/1633 beschrieben. Die Literaturstellen US-6,194,152 und WO-01/51633 offenbaren die Verwendung der darin genannten Sequenzen zur Detektion von Tumorzellen sowie verschiedener Substanzklassen in allgemeiner Weise zur Behandlung von Prostatakrebs.

25

Menthol ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der natürlicherweise als Monoterpen in der Pfefferminze vorkommt und den Hauptbestandteil des Pfefferminzöls ausmacht. Menthol induziert Kälteempfinden auf der Haut sowie in Mund und Nase durch Anregung bestimmter Nervenzellen. Eine weitere, ein Kälteempfinden auslösende Substanz ist Icilin. Beide Substanzen aktivieren periphere Nervenzellen, wobei der Ionenkanal TRPM8 selektiv aktiviert wird und Ionen, wie

Ca²⁺ und Na⁺ in die Zelle einfließen können. Aus den Literaturstellen McKemy et al., Nature 416(6876):52-52 (2002) und Peier et al., Cell 108(5):705-715 (2002) ist es bekannt, dass das human-orthologe TRPM8 in Mäusen und Ratten als Mentholsensor funktioniert. Gleiches ist für Icilin bekannt. Ferner fungiert TRPM8 als Kälterezeptor in einem Temperaturbereich von 8 °C bis 25 °C.

Eine physiologische Funktion von TRPM8 in Tumorgewebe ist unbekannt.

Insbesondere Prostatakrebs ist eine mit zunehmendem Alter mit beachtlicher Inzidenz auftretende Erkrankung. Bislang wird Prostatakrebs im wesentlichen pathologisch diagnostiziert und meist durch Entfernung der Prostata behandelt. Die Entfernung der Prostata hat verschiedene nachteilige Effekte auf einen Patienten. Eine verbesserte Diagnose und Behandlung dieser Krebsart, insbesondere ohne das Erfordernis einer Entfernung der Prostata, ist daher in hohem Maße wünschenswert.

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs-Erkrankungen, anzugeben.

Grundzüge der Erfindung sowie bevorzugte Ausführungsbeispiele.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung
5 die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

10 Die Erkenntnis beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass in Tumoren, die eine erhöhte Expression des Ionenkanals TRPM8 aufweisen, die Aktivierung des TRPM8 das Tumorstromwachstum inhibiert bzw. verlangsamt. Insbesondere eine permanente Aktivierung destabilisiert spezifisch den Ionenhaushalt der Tumorzellen, welche dadurch in die Apoptose getrieben werden.
15

Bevorzugt eingesetzt wird eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthylderivate, Pyrrolidinylderivate des Furanon, Icilin, Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen". Der Begriff Menthol umfaßt alle Enantiomere sowie Mischungen der Enantiomere. Entsprechendes gilt für andere genannte Substanzen bzw. Substanzklassen mit Symmetriezentren. Desweiteren
20 können auch strukturell von den vorstehenden Substanzen verschiedene Substanzen verwendet werden, wobei als wesentliches Auswahlkriterium die Aktivierung von TRPM8 anzusehen ist. Beispiel für eine solche verschiedene Substanz ist 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramid.
25

30

Menthylderivate können insbesondere gemäß Formel I aufgebaut sein, wobei ... eine Einfach- oder Doppelbindung sein kann, wobei ... eine Einfachbindung oder keine Bindung

sein kann, wobei nicht dargestellte Valenzen des Kohlenstoffs mit -H abgesättigt sind, wobei R1 = -H, -OH, -SH, -NR11R12, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl, beispielsweise Methyl oder Ethyl, wobei R11 und R12 gleich oder verschieden und -H, C1 bis C10-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl sein können, wobei R2 = -OR21, -SR21, -CO-R22, oder -O-CO-R23 sein kann, wobei R21 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, sein kann, wobei R22 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, oder -NR221R222 sein kann, wobei R221 und R222 gleich oder verschieden und -H, C1 bis C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, sein können, wobei R23 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, sein kann. Beispiele für Menthylderivate sind. Isopulegol (... = Doppelbindung, ... = keine Bindung, R2 = -OH), Menthoxypropan-1,2-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -O-CH2-CHOH-CH2-CH2OH), N-Ethyl-p-menthan-3-carboxamid (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -CO-NH-CH2-CH3) und p-Menthan-3,8-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -OH, R2 = -OH). Weitere Beispiele sind 3-Menthyl-3,6-dioxaheptanoat, 3-Menthylmethoxyacetat, 3-Menthyl-3,6,9-trioxadecanoat, 3-Menthyl(2-hydroxyethoxy)acetat und Menthyl-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecanoat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht oder

-OH substituiert). Ein weiteres Beispiel ist Menthylactat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -O-CO-R23 und R23 = Hydroxyethyl).

5 Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon können insbesondere gemäß Formel II. aufgebaut sein, wobei R1 und R2 zumindest einfach vorliegen, wobei die Bindung von R1 und R2 an je-
der freien Kohlenstoffvalenz des Furanonringes erfolgen kann, wobei freie Kohlenstoffvalenzen durch Wasserstoff
10 abgesättigt sind, wobei R1 Pyrrolidin, nicht, einfach oder mehrfach substituiert sein kann, insbesondere durch C1-C10-Alkyl, -Aalkyl, Aryl, -OH, -NH2, wobei Pyrrolidin vorzugsweise über N an den Furanonring gebunden ist, wobei R2 = C1-C10-Alkyl, -Aalkyl, -Aryl, -OH, -NH2 sein kann,
15 und wobei vorzugsweise R2 einfach oder zweifach vorliegt und wobei R1 vorzugsweise einfach vorliegt. Beispiele sind: 5-Methyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3-[2H]-furanon,
4,5-Dimethyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon,
4-Methyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon.

20

Icilin ist in Formel III dargestellt. Mit umfaßt sind auch Icilin-Derivate, welche TRPM8 aktivieren. Dies läßt sich gemäß der Ausführungsbeispiele unschwer testen.

25 Allen genannten Stoffen gemeinsam ist, dass sie Kälteempfinden bei Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten auflösen.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen in fachüblicher Wei-
30 se galenisch hergerichtet werden, vorzugsweise zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion. Die Dosis liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 5000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen

auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeeinheiten. Es ist zweckmäßig, die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise 5 zumindest 8 Wochen, höchstvorzugsweise zumindest 20 Wochen, herzurichten. Hiermit verbunden ist ein Behandlungsplan, welcher die andauernde Gabe in diesen Zeiträumen vorsieht. Eine diskontinuierliche periodische Gabe erfolgt dadurch, dass in definierten Zeitperioden einmalige Gabe 10 erfolgen. Die Zeiträume können beispielsweise im Bereich von 1 Stunde bis 7 Tage liegen. Eine kontinuierliche Gabe erfolgt mit geeigneten Systemen, welche eine kontinuierlich Freisetzung der Substanz bewirken. In Frage kommen beispielsweise an bzw. in polymere Mikropartikel adsorbierte 15 therapeutische Substanzen, wobei die Substanzen langsam aus den injizierten Mikropartikeln freigegeben werden. Solche Systeme sind in umfangreichen Varianten dem Durchschnittsfachmann bekannt. Zu den kontinuierlich Wirkstoffe abgebenden Systemen gehören auch transdermale Systeme, 20 welche dem Durchschnittsfachmann ebenfalls in umfangreichen Varianten bekannt sind.

Die Erfindung lehrt schließlich auch ein Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostata- 25 krebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, dargereicht wird.

Im Rahmen der Erfindung ist es möglich, die erfindungsge- 30 mäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen in Verbindung mit lokaler Hypothermie einzusetzen, wobei die zu behandelnden Gewebe vorzugsweise auf eine Temperatur unterhalb 36 °C, insbesondere unterhalb 30°C, vorzugsweise unterhalb 25 °C,

gekühlt werden. Die Hypothermie kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Im Falle der diskontinuierlichen Hypothermie kann diese vor während und/oder nach der Gabe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgen.

Definitionen.

10 Im Rahmen dieser Beschreibung wird die Bezeichnung TRPM8 für alle humanen Isoformen, bekannt oder neu, auf Aminosäurenbasis, verwendet. Im Rahmen dieser Beschreibung wird TRPM8 auch Trpp8 genannt. Insbesondere sind die durch die in den Sequenzprotokollen offenbarten Nukleinsäuren
15 codierten Proteine und Peptide sowie die in den Sequenzprotokollen offenbarten Proteine bzw. Peptide umfaßt, ebenso wie die in den angegebenen Literaturstellen offenbarten TRPM8 Sequenzen bzw. die dadurch codierten Proteine oder Peptide. Mit diesem Begriff mit umfaßt sind auch die
20 im Rahmen dieser Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%, höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt,
25 und zwar berechnet gemäß dem Programm BLAST in der am Anmeldetag aktuellen Fassung. Weiterhin sind Sequenzen umfaßt, welche lediglich Teilsequenzen der explizit offenbarten Sequenzen, beispielsweise ein Exon oder mehrere Exons, oder komplementärer Sequenzen hierzu darstellen,
30 mit der Maßgabe, daß diese mit zumindest gleicher Affinität an ein protein- oder peptidspezifisches Zielmolekül, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten Substanzen, binden.

Im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Verwendungen umfassen die Begriffe der Proteine bzw. Peptide neben den Volllängen der offenbarten Sequenzen (siehe auch vorstehender Absatz) auch Teilsequenzen hieraus, und zwar mit einer Mindestlänge von 4 Aminosäuren, vorzugsweise 10 bis 30 Aminosäuren.

Der Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

10

Eine Tumorzelle überexprimiert TRPM8, wenn die Menge gebildeter TRPM8 RNA oder gebildeten TRPM8 Proteins in einer Tumorzelle höher ist als in Normalzellen gleichen Gewebetyps, vorzugsweise vom gleichen Patienten herrührend. Es versteht sich, dass für den Vergleich Tumor/Normal die gleichen Messverfahren verwendet werden. Dem Fachmann sind verschiedene Messverfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuren und/oder Proteinen bzw. Peptiden in Zellen bekannt, welche alle anwendbar sind.

20

Als Aktivator ist eine Verbindung oder Substanz bezeichnet, welche entweder die Bildung von TRPM8 fördert oder die Aktivität von gebildetem TRPM8 erhöht, bezogen auf die TRPM8 Aktivität in Abwesenheit des Aktivators. Insofern kann ein Aktivator einerseits eine Substanz sein, welche in der Entstehungskaskade von TRPM8 aktivierend eingreift. Auf der anderen Seite kann ein Aktivator eine Substanz sein, welche mit gebildetem TRPM8 eine Bindung eingeht, und zwar dergestalt, dass weitere physiologische Wechselwirkungen mit endogenen Substanzen erhöht sind, verglichen mit den gleichen Wechselwirkungen, jedoch ohne Bindung des Aktivators. Ein Aktivator erhöht vorzugsweise bei Kontakt mit TRPM8 exprimierenden Zellen erhöht den Transport von

Ionen in eine Zelle hinein oder daraus heraus gegenüber einer Zelle mit gleichem TRPM8 Expressionsniveau, jedoch ohne Kontaktierung mit den Aktivator. Der Ionentransport läßt sich beispielsweise gemäß der Literaturstelle Peier
5 et al., Cell 108(5):705-715 (2002) bestimmen.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen
10 beispielsweise Na^+ , K^+ , Li^+ oder Cyclohexylammonium infrage. Geeigente feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösun-
15 gen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als
20 Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss- oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa ste-
25 riles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, dass mindestens ein erfindungsgemäß verwendeter TRPM8 Aktivator in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten
30 und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen mit definierter Dosis gemischt und zu der gewünschten Darreichungsform hergerichtet ist.

Im Rahmen der vorstehenden Definition gegenüber dem engen Wortsinn erweiterte Begriffsbestimmungen umfassen auch die bestimmten Begriffe im engen Wortsinn. Ausführungen zu
5 einer Anspruchskategorie sowie zu einem selbstständigen Anspruch abhängige Ansprüche gelten entsprechend auch für Ansprüche anderer Kategorie.

10 Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1: Verringerung der Koloniebildungsrate.

HEK293 Zellen wurden nicht transfiziert, mit TRPM8 trans-
15 fiziert oder mit einem Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden in einem Soft Agar Assay (siehe Literaturstelle Shappel et al., Cancer Research 61:497-503 (2001)) eingesetzt. Die stark vereinzelt ausplattierten und im Agar immobilisierten Zellen wachsen dabei dreidimensional und
20 substratunabhängig. Die Koloniebildungsrate erlaubt Rückschlüsse auf die Tumorgenität der Zellen. Je 1000 Zellen wurden in der 6-Lochplatte in 2 ml Softagar-haltigem Medium ausplattiert und nach Erstarren des Agars mit 1 ml Medium (DMEM mit 10% FKS, 2mM Glutamin) überschichtet: Men-
25 thol, gelöst in Ethanol, wurde dem Medium in Endkonzentrationen von 10, 100 und 1000 μM zugegeben und jeden fünften Tag substituiert. Als Kontrolle wurde lediglich das Lösungsmittel zugegeben. Nach drei Wochen wurden die Anzahl der gebildeten Kolonien unter dem Mikroskop bestimmt. Die
30 TRPM8 transfizierten Zellen zeigen deutlich geringere Koloniebildung als die Wildtyp Zellen und die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Beispiel 2: Tumorwachstum in Nacktmäusen.

Humane TRPM8 cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1
5 subkloniert und anschließend stabil in HEK293 Zellen
transfiziert. Die Expression von TRPM8 Protein wurde im
Western-Blot mit TRPM8-spezifischen Antikörpern nachgewie-
sen. Für die Untersuchung der Wirkung von Menthol oder
Icilin auf das Tumorwachstum in vivo wurden je 2 Millionen
10 HEK293-TRPM8 Zellen in männliche Nacktmäuse subkutan inji-
ziert oder in der Prostata xenotransplantiert. Die Ver-
suchsgruppen bestanden aus jeweils 10 Tieren. Die Kon-
trollgruppen wurden nicht bzw. nur mit DMSO behandelt.
Behandelt wurden die Tiere durch tägliche intraperitoneale
15 Applikation von 30 mg/kg Körpergewicht Icilin oder Men-
thol, gelöst in DMSO, über einen Zeitraum von drei Wochen.
Das Wachstum der subkutan injizierten Zellen wurde über
die gesamte Versuchsdauer zweimal wöchentlich vermessen.
Unmittelbar nach Beendigung der Versuche wurden die Xe-
20 notranplantate resektiert, gewogen und asserviert. Im Er-
gebnis zeigten die behandelten Tiere ein deutlich geringe-
res Tumorwachstum als die nicht behandelten Kontrolltiere.

25 Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen

In den Sequenzprotokollen sind TRPM8 Sequenzen, insbeson-
dere Splice Varianten angegeben. Im Falle der Nukleinsäu-
resequenzen kodieren diese für Proteine, Peptide oder
30 Teilsequenzen von Proteinen oder Peptiden, die im Rahmen
der Erfindung aktivierbar sind. Im Falle der Aminosäuren-
sequenzen handelt es sich um im Rahmen der Erfindung akti-
vierbare Proteine, Peptide oder Teilsequenzen von

Proteinen oder Peptiden. Weitere Sequenzen für TRPM8 sind der eingangs genannten Literatur zu entnehmen.

5

10

15

20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ergänzung Seite 2 Hintergrund der Erfindung

Neuroendokrine Tumoren (NET), die früher auch als Karzinoidtumoren bezeichnet wurden, sind potentiell maligne Tumoren, die sich aus hormonproduzierenden (endokrinen) Zellen entwickeln. NET des Gastrointestinaltraktes werden auch als Gastro-Entero-Pankreatische (GEP) bezeichnet. Auch in Organen der Atemwege z.B. den Bronchien oder der Lunge können NET entstehen. Über die Kalzium-Homöostase dieser seltenen Krebserkrankungen insbesondere die Rolle von TRP Kanälen in NET ist wenig bekannt.

Ergänzung Seite 10 Definitionen

Nanosuspension (Nanokristalle in wässriger Lösung kleiner als 1µm)

Ergänzung Seite 14 Ansprüche

Verwendung nach Anspruch 1 wobei die Tumorerkrankung neuroendokrine Tumoren insbesondere des Gastrointestinaltraktes und der Atmungsorgane sind.

Ersatz Formeln I-III durch neue Zeichnungen

Ergänzung Ausführungsbeispiele

Aus Beispiel 1 Verringerung der Koloniebildungsrate wird Beispiel 5

Aus Beispiel 2 Tumorwachstum in Nacktmaisen wird Beispiel 6

Aus Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen wird Beispiel 10

Beispiel 1: Icilin induziert Zytotoxizität in TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30µM, 10µM, 3µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert. Es zeigte sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt von Icilin auf HEK293 TRPM8 Transfektanden, aber nicht auf Kontrollzellen. Die Zytotoxizität korreliert

mit einer dramatischen Änderung der Zellmorphologie. Zellmorphologie DMSO hatte keinen Einfluß auf Zellwachstum oder Zellmorphologie.

Beispiel 2: Icilin wirkt anti-proliferatorisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10µM, 5µM, 1µM und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 3: Icilin wirkt pro-apoptotisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10µM, 5µM, 1µM und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Apoptoseassays z.B PARP-Western Blot gemacht.

Beispiel 4: Icilin wirkt anti-proliferatorisch auf LNCaP Zellen

Je 8000 Zellen der Prostata tumorzelllinie LNCaP wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30µM und 3µM versetzt. Ferner wurden Paclitaxel (Pax) in einer Konzentration von 10nM und in Kombination mit Icilin in den vorher genannten Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in

LNCaP Zellen, die TRPM8 endogen exprimieren, eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Auch Paclitaxel wirkt proliferationsinhibierend. Die Kombination von Icilin mit Paclitaxel wirkt stärker proliferationsinhibierend als beide Substanzen allein (Synergismuseffekt). Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B. MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 5: Icilin bewirkt eine Verringerung der Koloniebildungsrate

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K51, K52) wurden in Softagar immobilisiert. Als Maß für das substratunabhängige Wachstum wurde die Koloniebildungsrate bestimmt. In 2ml Medium in der 6-Loch Platte wurden 1000 Zellen ausplattiert. Die Zugabe von Icilin in den Endkonzentrationen 1µM und 100µM sowie die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Ko) entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration wurde nach jeweils 48h im Überstand substituiert. Der Überstand (2ml) wurde jeweils nach 96h ausgetauscht. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die im Agar gewachsenen Kolonien mit Neutralrot angefärbt, auf Zellstoff getrocknet und fotografiert. Die Zugabe von Icilin bewirkt eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Anzahl lebender Kolonien.

Beispiel 6: Icilin reduziert Tumorwachstum in Nacktmausen

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K52) wurden intra-peritoneal (i.p.) in Nacktmause xenotransplantiert (NMRI-nu/nu, 9 Wochen alt, männlich, 2 Millionen Zellen pro Tier). Die Tiere wurden jeden 3. Tag über einen Zeitraum von 14 Tagen mit 20µl einer 100mM Icilin-Lösung in DMSO i.p. behandelt. Die Kontrollgruppe wurde unter selben Bedingungen nur mit DMSO behandelt. Das Tumorwachstum wurde durch tägliche Bestimmung des Körpergewichtes verfolgt. Die Icilinbehandlung bewirkte ein deutlich reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrollgruppe.

Beispiel 7: TRPM8 ist in neuroendokrinen Tumoren exprimiert

A) Aus einem Lungenadenokarzinom sowie zwei Lungentumoren mit neuroendokriner Differenzierung wurde Tumor -und korrespondierendes Normalepithelgewebe herausgeschnitten. Die mRNA wurde präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Gezeigt ist die relative Expression von Tumor- versus Normalepithelgewebe. Die Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung zeigen eine deutliche TRPM8 Expression, wohingegen im Adenokarzinom keine relevante TRPM8 Expression vorhanden ist.

B) Aus humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien, die aus Pankreaskarzinomen (BON-1, QGP-1) bzw. Kolonkarzinom (LCC-18) stammen, wurde mRNA präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA im Vergleich zu TRPM8 positiven LNCaP Prostatatumorzellen. Alle drei getesteten neuroendokrinen Tumorzelllinien exprimieren TRPM8 in signifikanten Mengen.

Beispiel 8: Icilin wirkt pro-apoptotisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1µM, 10µM und 100µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in QGP-1 Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während kaum Effekte bei Kontrollzellen zu beobachten war.

Beispiel 9: Iolin wirkt anti-proliferatorisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1µM, 10µM und 100µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt ist die Proliferationsrate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in QGP-1 Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Patentansprüche:

1. Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.
5
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorerkrankung Prostatakrebs ist.
3. Verwendung einer Substanz, vorzugsweise nach Anspruch 1
15 oder 2, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthylderivate, Pyrrolidinylderivate des Furanon, Icilin, Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Prostatakrebs.
20
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Substanz oder die Mischung solcher Substanzen mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen galenisch hergerichtet wird.
25
5. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend eine TRPM8 aktivierende Substanz und/oder eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthylderivate, Pyrrolidinylderivate des Furanon, Icilin,
30

Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" sowie übliche Hilfs- und Trägerstoffe, vorzugsweise galenisch zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion hergerichtet.

5

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die Dosis im Bereich von 0,1 bis 1000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeeinheiten.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise zumindest 8 Wochen, hergerichtet ist.

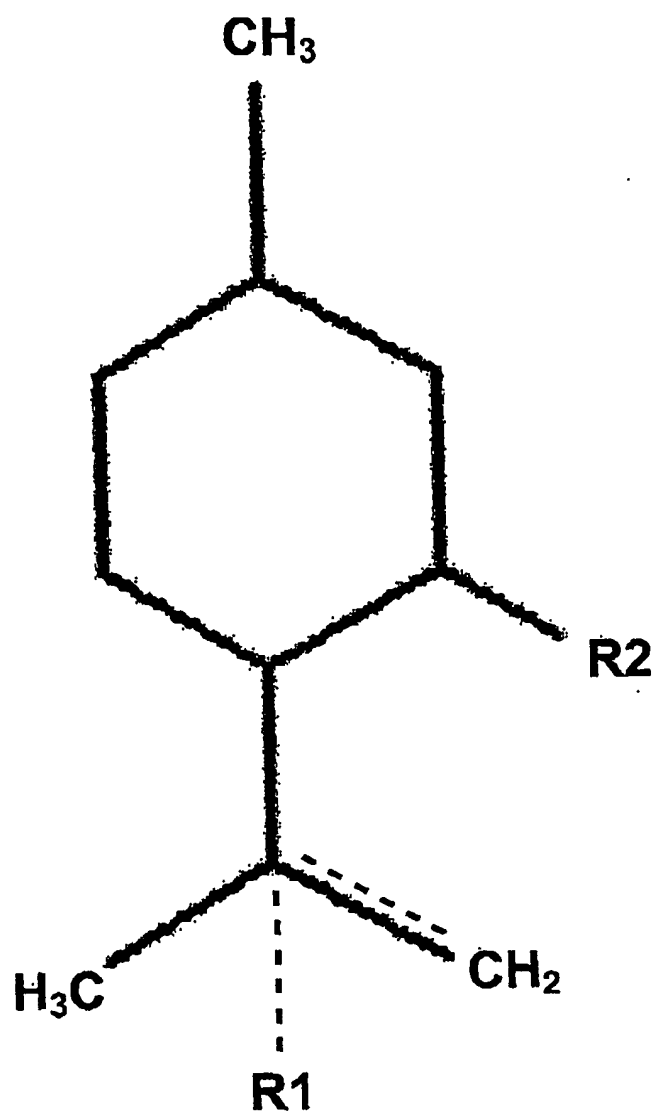
20

8. Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, insbesondere eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dargereicht wird.

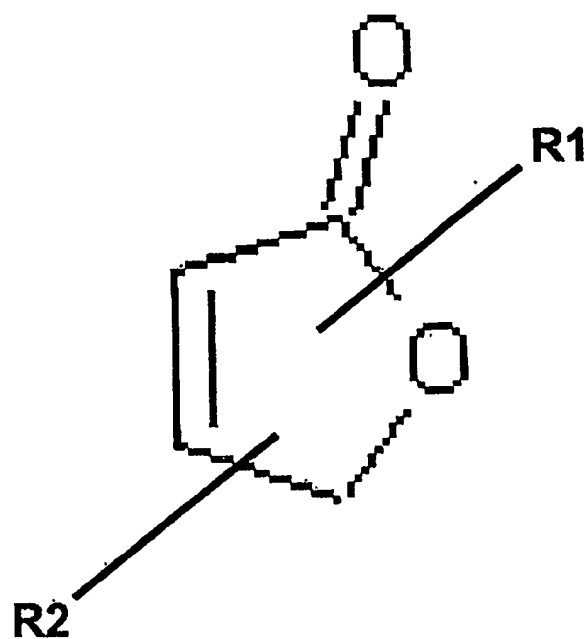
25

30

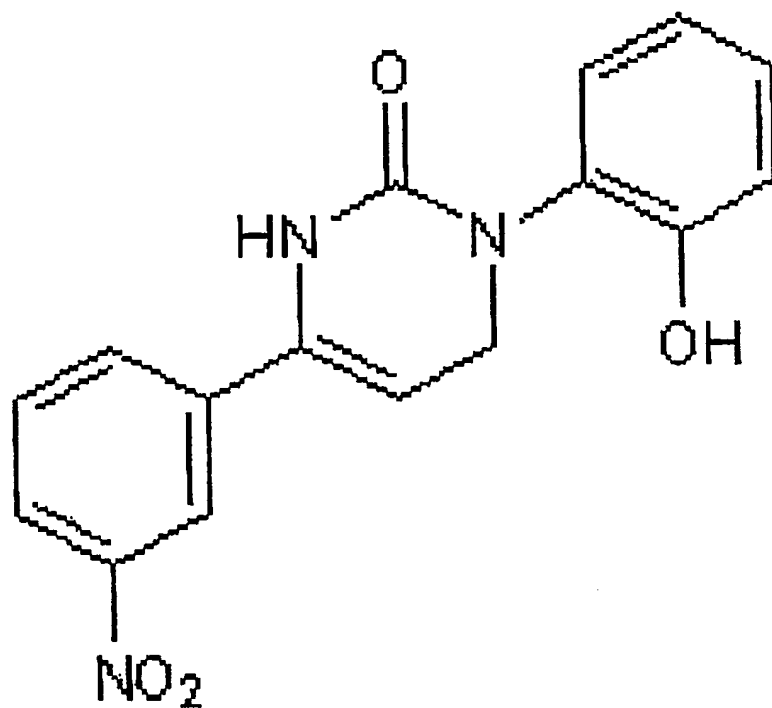
10/539874



Formel I
Fig. 1



Formel II
Fig. 2



Formel III
Fig. 3

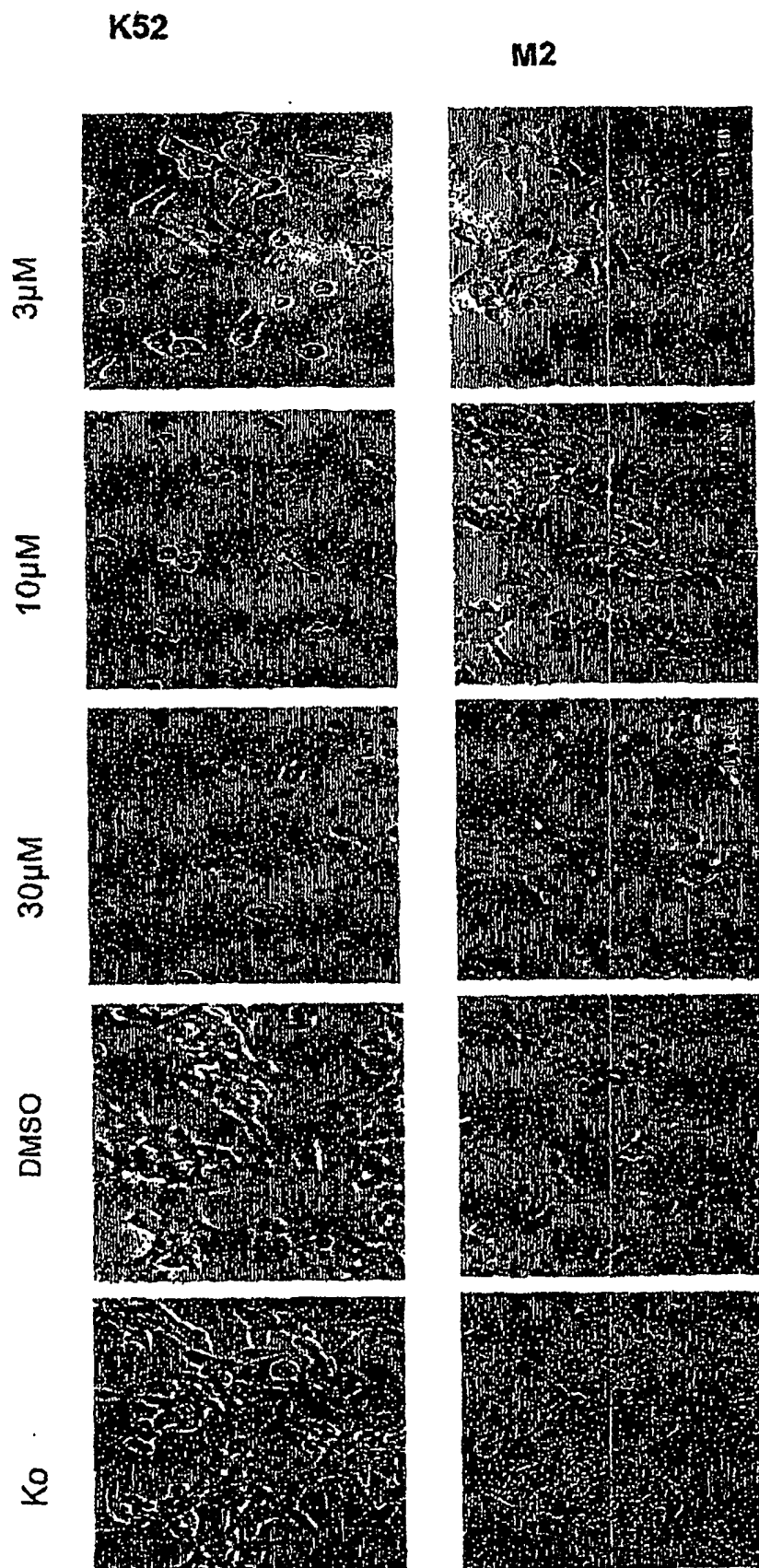
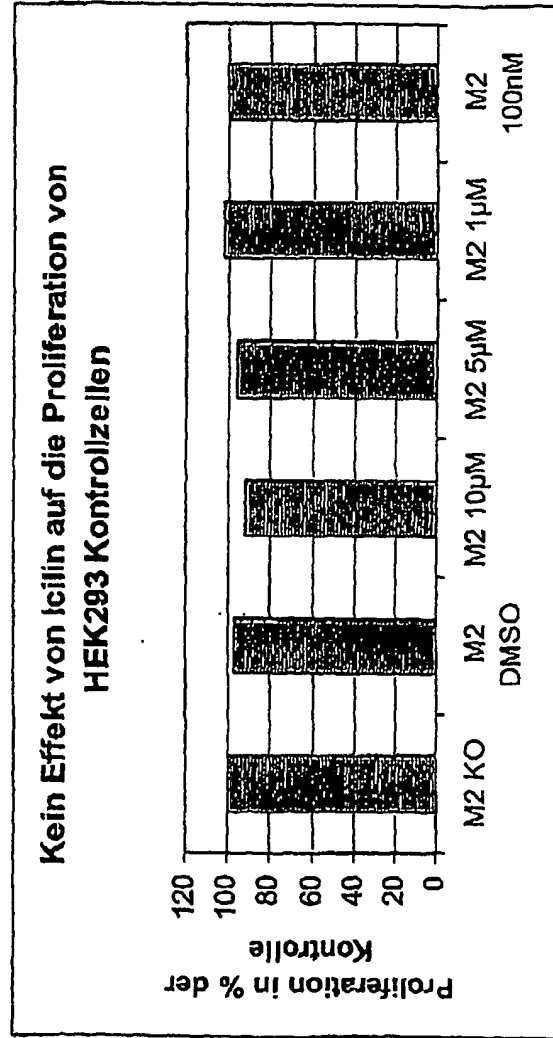
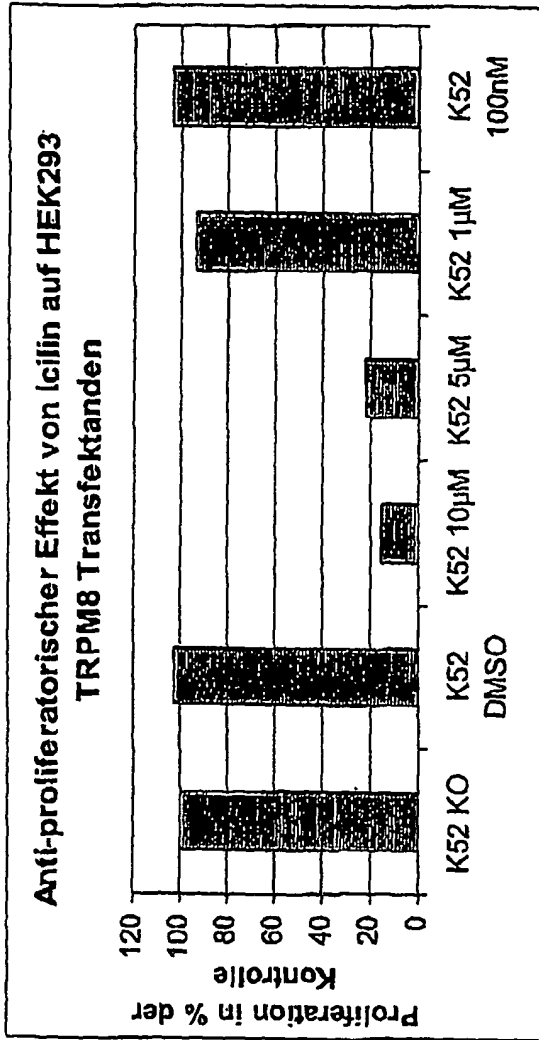


Fig. 4

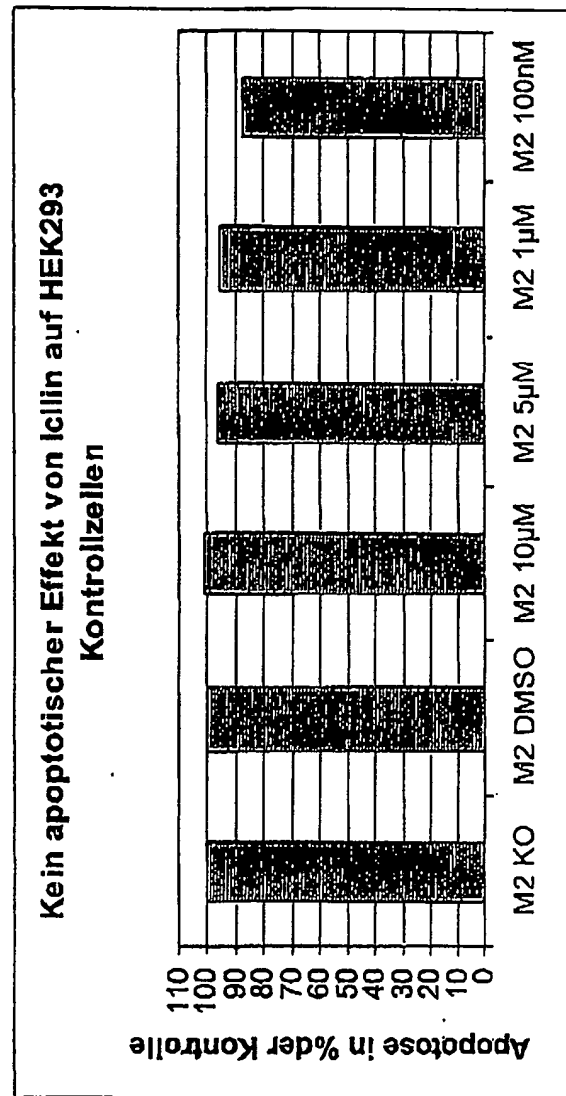
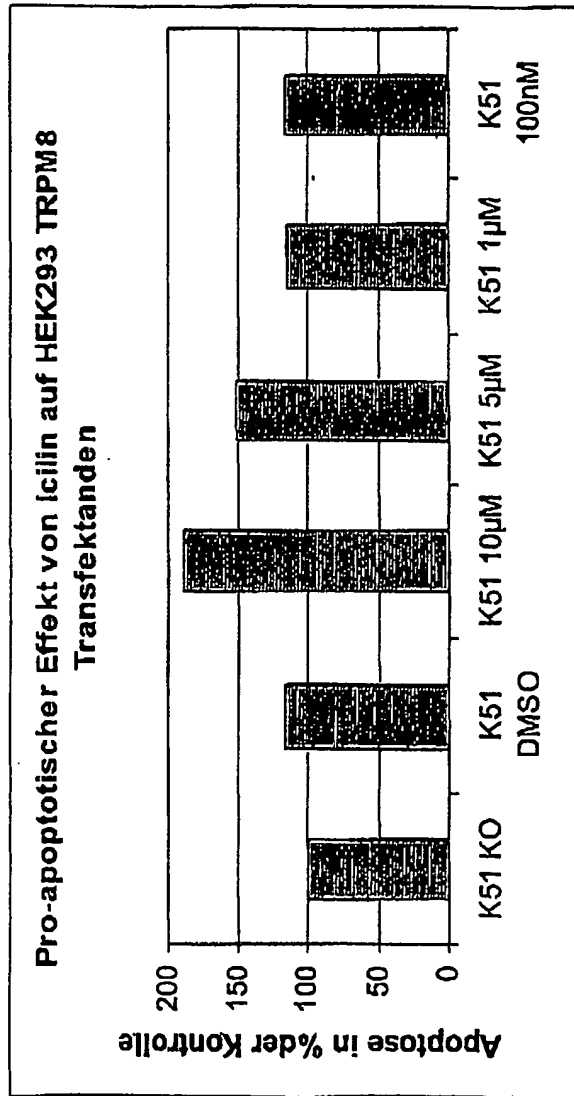
Beispiel 1

Fig. 5



Beispiel 2

Fig 6



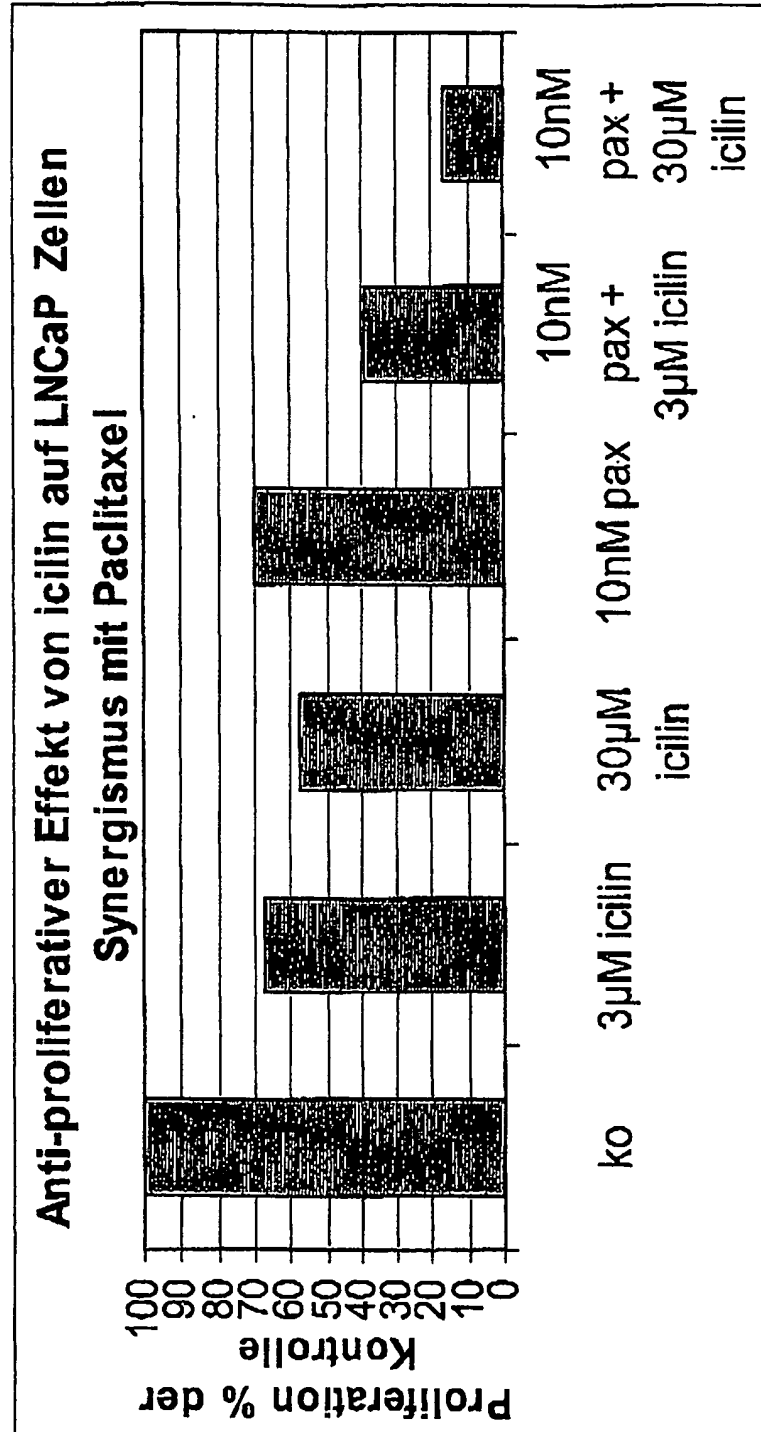


Fig. 7

Beispiel 4

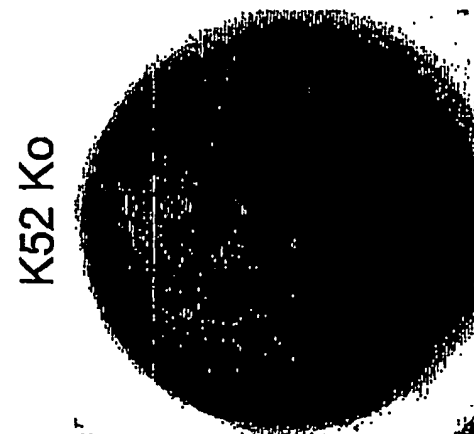
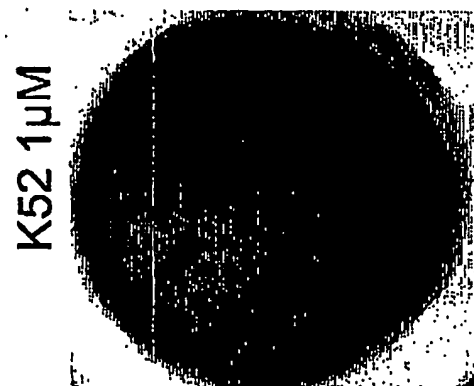
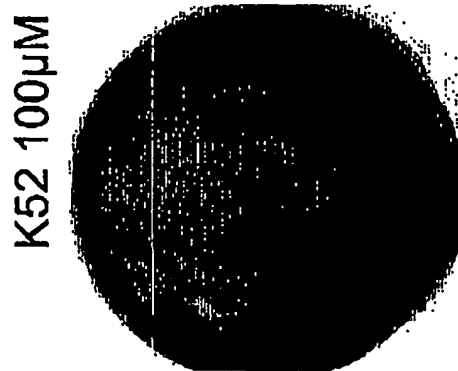
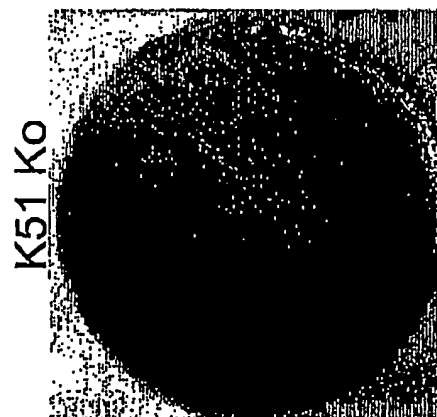
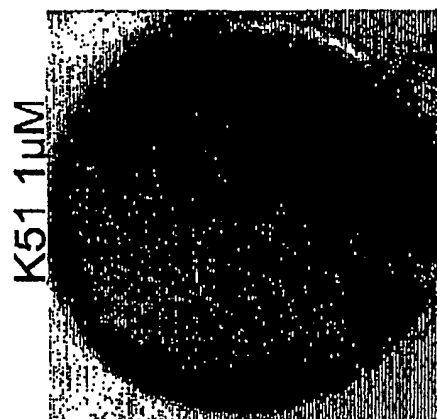
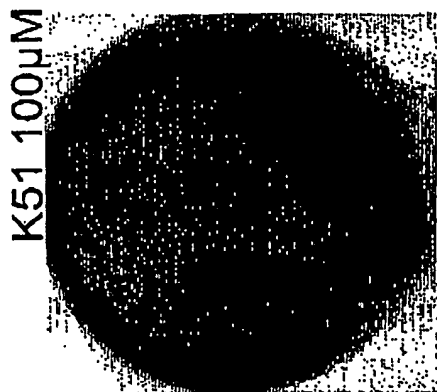


Fig. 8

Beispiel 5

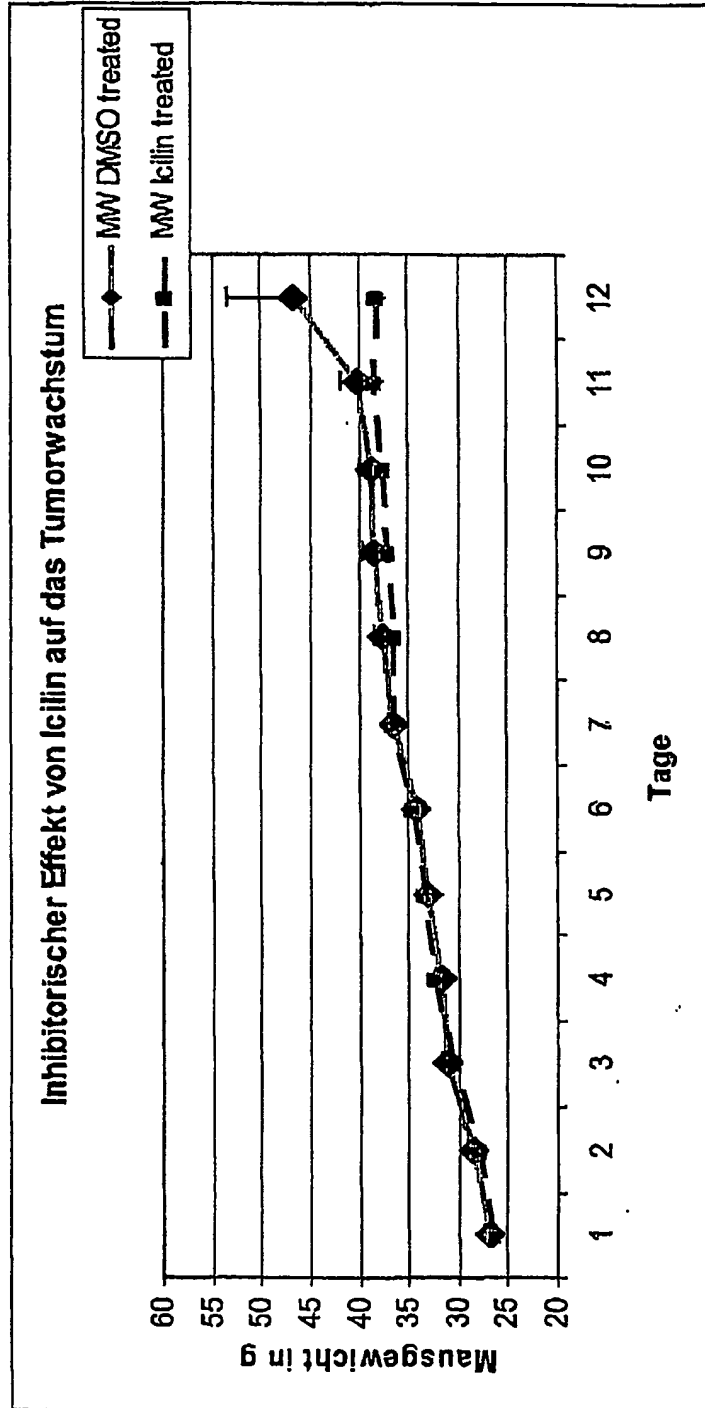
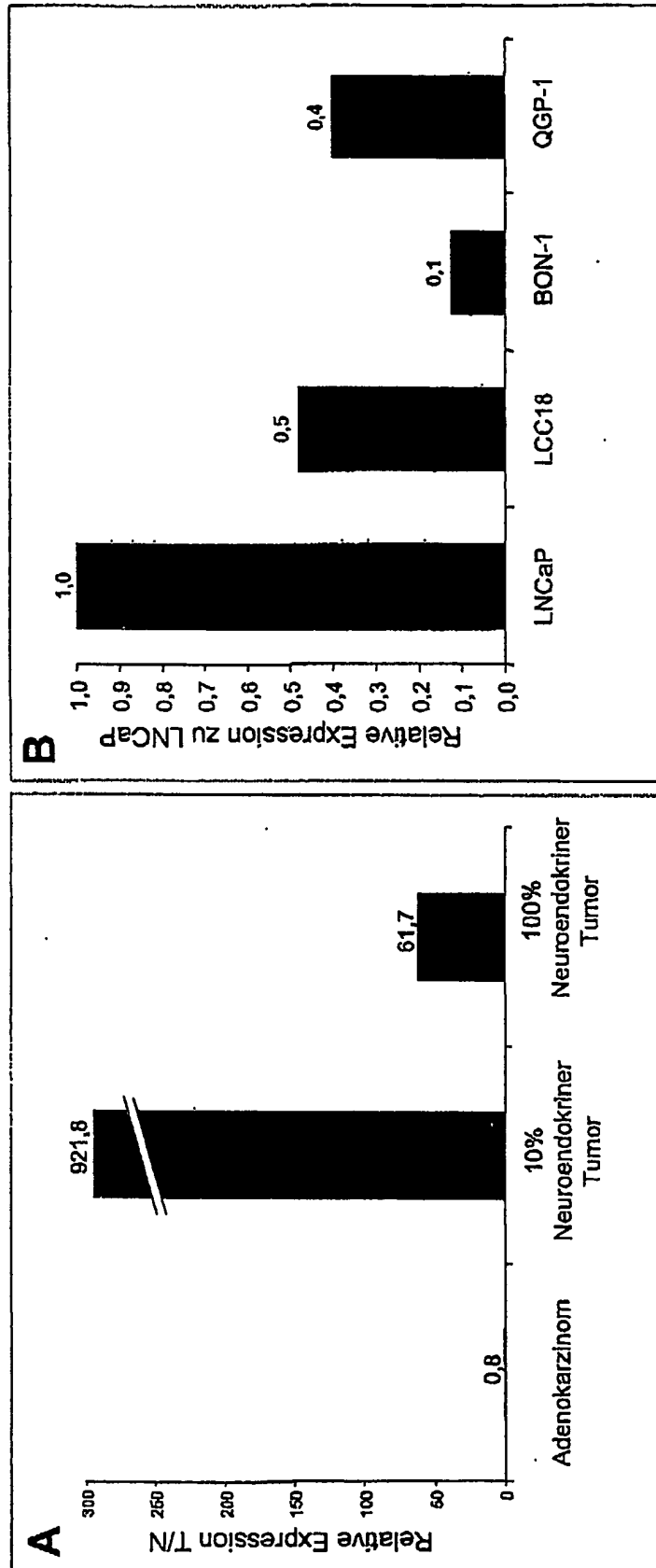


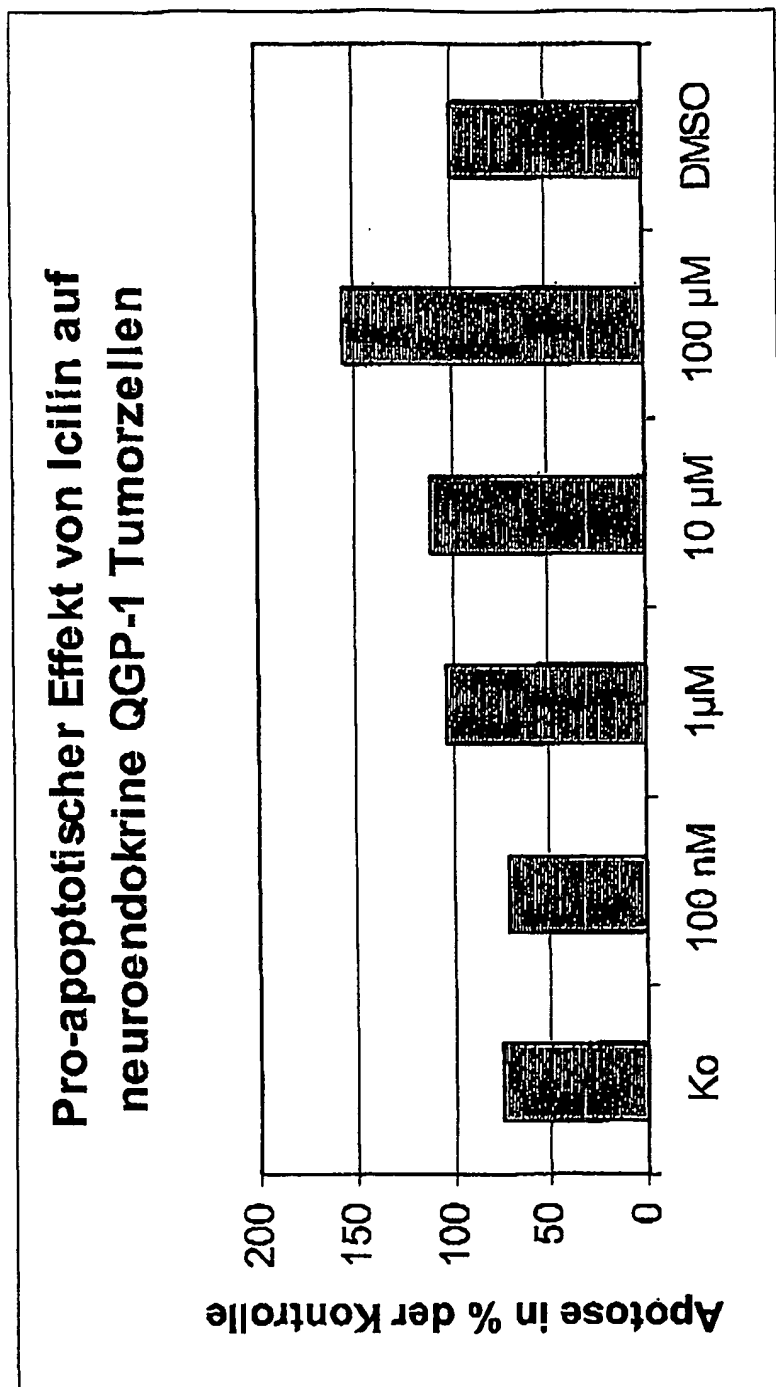
Fig. 9

Beispiel 6

Fig. 10



Beispiel 7

*Fig. 11*

Beispiel 8

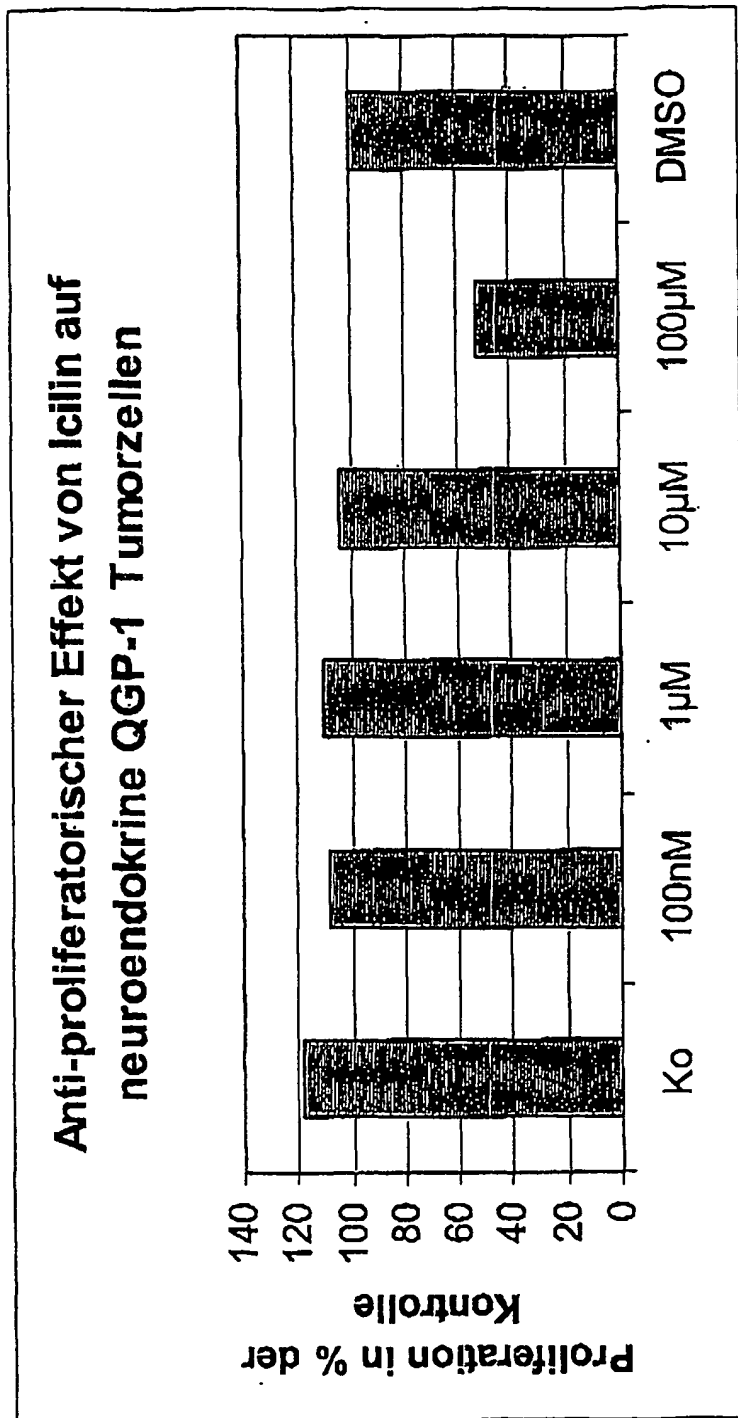


Fig. 12

SEQUENCE LISTING

<110> metaGen Pharmaceuticals GmbH
<120> Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung
<130> MET/DE/0227
<160> 17
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1000
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
atccttggggt gaaagaaaat cctgcttgac aaaaaccgtc acttaggaaa agatgtcctt 60
tcgggcagcc aggctcagca tgaggaacag aaggaatgac actctggaca gcacccggac 120
cctgtactcc agcgcgtctc ggagcacaga cttgtcttac agtgaaagcg acttggtgaa 180
ttttattcaa gcaaatttta agaaacgaga atgtgtcttc tttaccaaag attccaaggc 240
cacggagaat gtgtgcaagt gtggctatgc ccagagccag cacatggaag gcacccagat 300
caaccaaagt gagaaatgga actacaagaa acacaccaag gaatttccta ccgacgcctt 360
tggggatatt cagtttgaga cactggggaa gaaaggggaag tatatacgtc tgtcctgcga 420
cacggacgcg gaaatccttt acgagctgct gaccacgac tggcacctga aaacacccaa 480
cctggtcatt tctgtgaccg ggggcgccaa gaacttcgcc ctgaagccgc gcatgcgcaa 540
gatcttcagc cggctcatct acatcgcgca gtccaaaggt gcttggattc tcacgggagg 600
caccattat ggcctgatga agtacatcg ggaggtgggt agagataaca ccatcagcag 660
gagttcagag gagaatattg tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaccg 720
ggacaccctc atcaggaatt gcgatgctga ggtaccggtg ggacaggagg aggtctgcta 780
ggtcacatgg aagaaagacc atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgtgat 840
ggagccagcc agatcatggg gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg 900
aattgaaaac aaggatgacg tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatgtt 960
ttgttcatta aaatgtgttc tcagcaaaaa aaaaaaaaaa 1000

<210> 2
<211> 391
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
gccgactact actacctact actactaaat tcacggccgg tcgactgaag acttggcaga 60

acagctgctg gtctattcct gtgaagcttg ggggtggaagc aactgtctgg agctggcggt 120
 ggaggccaca gaccagcatt tcatcgccca gcctggggtc cagaattttc tttctaagca 180
 atggtatgga gagatttccc gagacaccaa gaactggaag attatcctgt gtctgtttat 240
 tatacccttg gtgggctgtg gctttgtatc atttaggtac aaaccaaggc acataatcgt 300
 gtgtgagtggt gtgtgccagt gtgtgtacat gcatccacat atgtgtgctc tcatgtaaatt 360
 gattaaaaag cctggaactt aaaaaaaaaa a 391

<210> 3

<211> 2136

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggactacatt attttcactc taagattgat ccacattttt actgtaagca gaaacttagg 60
 agccaagatt ataatgctgc agaggatgct gatcgatgtg ttcttcttcc tgttctctt 120
 tgcggtgtgg atggtggcct ttgcgtggcc aggcaaggga tccttaggca gaatgagcag 180
 cgctggaggt ggatattccg ttcggtcac ctagagccct acctggccat gttcggccag 240
 gtgccagtg acgtggatgg taagcctgac ttggctcaga tggaaacagc ttggaggagg 300
 catttgctcc ctgaaccaac cccaggggt gccccggaga ccgcacttca gaagcacgcg 360
 cgtgaaacgg agtccaacat aacagagtac cacgtatgac tttgcccact gcaccttcac 420
 tgggaatgag tccaagccta ctgtgtgtgg agctggatga gcacaacctg ccccggttcc 480
 ccgagtggat caccatcccc ctggtgtgca tctacatggt atccaccaac atcctgctgg 540
 tcaacctgct ggtcgccatg tttggctaca cgggtggcac cgtccagaga acaatgacca 600
 ggtctggaag ttccagaggt acttcctgggt gcaggagtac tgcagccgcc tcaatatccc 660
 ctcccccttc atcgtcttcg cttacttcta catggtggtg aagaagtgct tcaagtgttg 720
 ctgcaaggag aaaaacatgg agtcttctgt ctgctgtttc aaaaatgaag acaatgagac 780
 tctggcatgg gaggggtgtca tgaaggaaaa ctacctgtc aagatcaaca caaaagccaa 840
 cgacacctca gaggaaatga ggcacgatt tagacaactg gatacaaagc ttaatgatct 900
 caagggctctt ctgaaagaga ttgctaataa aatcaaataa aactgtatga actctaattg 960
 agaaaaatct aattatagca agatcatatt aaggaatgct gatgaacaat ttgctatcg 1020
 actactaaat gagagatfff cagacccttg ggtacatggg ggatgatfff aaatcacct 1080
 agtgtgctga gaccttgaga ataaagtgtg tgattggttt catacttgaa gacggatata 1140

aaggaagaat atttccttta tgtgtttctc cagaatggtg cctgtttctc tctgtgtctc 1200
aatgcctggg actggagggt gatagtttaa gtgtgttctt accgcctcct ttttccttta 1260
atcttatttt tgatgaacac atatatagga gaacatctat cctatgaata agaacctggt 1320
catgctttac tctgtattg ttattttgtt catttccaat tgattctcta cttttccctt 1380
ttttgtatta tgtgactaat tagttggcat attgttaaaa gtctctcaaa ttaggccaga 1440
ttctaaaaca tgctgcagca agaggacccc gctctcttca ggaaaagtgt tttcatttct 1500
caggatgctt cttacctgtc agaggagggt acaaggcagt ctcttgctct cttggactca 1560
ccaggctcct attgaaggaa ccacccccat tcctaaatat gtgaaaagtc gcccaaatg 1620
caaccttgaa aggactact gactttgttc ttattggata ctctcttat ttattatttt 1680
tccattaaaa ataatagctg gctattatag aaatttagac catacagaga tgtagaaaga 1740
acataaattg tccccattac ctttaaggtaa tcaactgctaa caatttctgg atggtttttc 1800
aagtctattt tttttctatg tatgtctcaa ttctctttca aaattttaca gaatgttatc 1860
atactacata tatacttttt atgtaagctt tttcacttag tattttatca aatatgtttt 1920
tatttatattc atagccttct taaacattat atcaataatt gcataatagg caacctctag 1980
cgattaccat aattttgctc attgaaggct atctccagtt gatcattggg atgagcatct 2040
ttgtgcatga atcctattgc tgtatttggg aaaattttcc aagggttagat tccaataaat 2100
atctatttat tattcaatat taaaaaaaaa aaaaaa 2136

<210> 4

<211> 1813

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gctagaattt accagtaagc catctgattt ccagtaagc catcctgggc ttttctttgt 60
tgaaaagcttt ttgattgctg attttcattt tcttcatttg ttgtttgtct gttcaggctt 120
tgtatttctt cttgattcag gtctttgtaa gttgtacatt tctgggatat ttccatttct 180
tctaggttgt ccaccttggt tgcataataat tgttcatact agccccctct gatccctttc 240
atctctatgc cctctgttgt aagggtgtct ttctcatttc tgactgtatt tatttgtatc 300
ttcttccttt tcttaaaagg ttgttgatt ttgtttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
ctttcaatga ttttttttcc cattgttttt caactctctt ttttaaaaaat gtattttgct 420

cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac 480
 aaggctcttt caaaagctcc tatagggaat acaaaatttc cccatctcct tataaccagaa 540
 aacaaagtta tttaacaattc atcttaagtc tcttaatgat ctcaagggtc ttctgaaaga 600
 gattgctaataaaaatcaaataaaactgtatgaactctaattggagaaaaatctaattatag 660
 caagatcata ttaaggaatg ctgatgaaca attttgctat cgactactaa atgagagatt 720
 ttcagacccc tgggtacatg gtggatgatt ttaaatacacc ctagtgtgct gagaccttga 780
 gaataaagtg tgtgattggt ttcatacttg aagacggata taaaggaaga atatttcctt 840
 tatgtgtttc tccagaatgg tgcctgtttc tctctgtgct tcaatgcctg ggactggagg 900
 ttgatagttt aagtgtgttc ttaccgcctc ctttttcctt taatcttatt ttgatgaac 960
 acatatatag gagaacatct atcctatgaa taagaacctg gtcattgcttt actcctgtat 1020
 tgttattttg ttcatttcca attgattctc tacttttccc ttttttgtat tatgtgacta 1080
 attagttggc atattgttaa aagtctctca aattaggcca gattctaaaa catgctgcag 1140
 caagaggacc ccgctctctt caggaaaagt gttttcattt ctcaggatgc ttcttacctg 1200
 tcagaggagg tgacaaggca gtctcttgct ctcttggaact caccaggctc ctattgaagg 1260
 aaccaccccc attcctaaat atgtgaaaag tcgccccaaa tgcaaccttg aaaggcacta 1320
 ctgactttgt tcttattgga tactcctctt atttattatt tttccattaa aaataatagc 1380
 tggctattat agaaatttag accatacaga gatgtagaaa gaacataaat tgtccccatt 1440
 accttaaggt aatcactgct aacaatttct ggatgggttt tcaagtctat tttttttcta 1500
 tgtatgtctc aattctcttt caaaatttta cagaatgtta tcatactaca tatatacttt 1560
 ttatgtaagc tttttcactt agtattttat caaatatggt tttattatat tcatagcctt 1620
 cttaaacatt atatcaataa ttgcataata ggcaacctct agcgattacc ataattttgc 1680
 tcattgaagg ctatctccag ttgatcattg ggatgagcat ctttgtgcat gaatcctatt 1740
 gctgtatttg ggaaaatttt ccaagggttag attccaataa atatctattt attattcaat 1800
 attaaaaaaaa aaa 1813

<210> 5

<211> 986

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acctggctaa tttttgtatt tttagtagac acgggggttc accatgttgg ccaggctggt 60

ctcgaaactcc tgacctcagg tgatttgccct gcctcggcct cccaagtgtt gggattacag 120
 gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcagggtt tcttaattgc agagcttagt gtggtatact 180
 ttctgaaggc atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgtcatagt 240
 ccaccagcta tgatctgctt aaaacagctg cctgctgggc gccatgtttg gctacacggc 300
 gggcacccgtc caggagaaca atgaccaggc ctggaagttc cagaggtact tcctgggtgca 360
 ggagtactgc agccgcctca atatccctt ccccttcac gtcttcgctt acttctacat 420
 ggtgggtgaag aagtgtttca agtgttgctg caaggagaaa aacatggagt cttctgtctg 480
 ctgtttcaaa aatgaagaca atgagactct ggcattggag ggtgtcatga aagaaaacta 540
 ccttgtcaag atcaacacaa aaaccaacga cacctcagag gaaatgaggc atcgatttag 600
 acaactggat acaaagatca tattaaggaa tgctgatgaa caattttgct atcgactact 660
 aaatgagaga ttttcagacc cctgggtaca tgggtggatga ttttaaatca ccctagtgtg 720
 ctgagacctt gagaataaag tgtgtgattg gtttcatact tgaagacgga tataaaggaa 780
 gaatatttcc tttatgtgtt tctccagaat ggtgcctgtt tctctctgtg tctcaatgcc 840
 tgggactgga ggttgatagt ttaagtgtgt tcttacgcc tcctttttcc tttaatctta 900
 tttttgatga acacatatat aggagaacat ctatcctatg aataagaacc tggatcatgt 960
 ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 986

<210> 6

<211> 929

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

ggcacgaggc tgcctttctc caccagagac tcttcctcag ggaggacttg gtgaatttta 60
 ttcaagcaaa ttttaagaaa cgagaatgtg tcttctttac caaagattcc aaggccacgc 120
 tcaatgaaat ccttccttcc tgtccacacc atcgtgctta tcaggagagaa tgtgtgcaag 180
 tgtggctatg ccagagacca gcacatggaa ggcacccaga tcaaccaaag tgagaaatgg 240
 aactacaaga aacacaccaa ggaatttcct accgacgcct ttggggatat tcagtttgag 300
 aactgggga agaaaggga gtatatacgt ctgtcctgcg acacggacgc ggaaatcctt 360
 tacgagctgc tgaccagca ctggcacctg aaaacacca acctggatcat ttctgtgacc 420
 gggggcgcca agaacttcgc cctgaagccg cgcacgcgca agatcttcag cgggtcctc 480

tacatcgcgc agtccaaagg tgcttggatt ctacacgggag gcacccatta tggccgatga 540
 agtacatcgg ggaggtggtg agagataaca ccatcagcag gagttcagag gagaatattg 600
 tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaccg ggacaccctc atcaggaatt 660
 gcgatgctga ggtaccggtg ggacaggagg aggtctgcta ggtcacatgg aagaaagacc 720
 atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgtgat ggagccagcc agatcatggg 780
 gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg aattgaaaac aaggatgacg 840
 tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatgtt ttgttcatta aaatgtgttc 900
 tcagcaatct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 929

<210> 7

<211> 735

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

ttggccttca gagcaaagaa ggagatctgc atctctacac ccagatggag aatcacccctc 60
 actttgcagc tgaaggcaat gtggagttga tgttatttta taccatttat ttttattatc 120
 tcttcacaac aaacctacta agtcaatgtt atgattccat gctgcaaaca aggaaattaa 180
 gcctcagcaa tcctgatatt ctggaacaga acaatccttt aagagatttg gtattgaaga 240
 ccttgttgga aatggatcag acattgccca gaccactgtc cagacccaac actggaataa 300
 cccaggagag cttcgtgctt acctcccacg ggcggtcatt ggtgaaaatc tcatcattgg 360
 ctaagtccag ctgggtccac tccagcagaa gcttcagctg cccattccag ttatccttgt 420
 cttgctcact ggtgctgaag gctgtgagag ggcaggaaaa gactcaactc accaaaggct 480
 cagaaataag agtgagaacc attcagtgtg gccaatatc agagctgttt atcacagatc 540
 gtatttgttc ttaaattgga tctaccagaa gaagacagcc agctttcgat actaacaac 600
 cacaatggaa gatggccgta tttatcattg ccttttagcat gttaaagggt acataccaca 660
 ttgaccctgg cagaagcatt cctgatgtgt tggaaaaatt aagagaaata acagttcttt 720
 ggcaataaaa aaaaa 735

<210> 8

<211> 84

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Gln Ser Lys Glu Gly Asp Leu His Leu Tyr Thr Gln Met Glu
 1 5 10 15

Asn His Pro His Phe Ala Ala Glu Gly Asn Val Glu Leu Met Leu Phe
 20 25 30

Tyr Thr Ile Tyr Phe Tyr Tyr Leu Phe Thr Thr Asn Leu Leu Ser Gln
 35 40 45

Cys Tyr Asp Ser Met Leu Gln Thr Arg Lys Leu Ser Leu Ser Asn Pro
 50 55 60

Asp Ile Leu Glu Gln Asn Asn Pro Leu Arg Asp Leu Val Leu Lys Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Met

<210> 9
 <211> 249
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gtaccggtgg gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatgggc 60
 ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtgatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct .. 120
 ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attgaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180
 ctgctgggaa agagttaaca atgaatgttt tgttcattaa aatgtgttct cagcaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa 249

<210> 10
 <211> 115
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 gtacaaacca aggacataa tcgtgtgtga gtgtgtgtgc cagtgtgtgt acatgcatcc 60
 acatatgtgt gctctcatgt aaatgattaa aaagcctgga acttaaaaaa aaaaa 115

<210> 11
 <211> 127
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gtaagcctga cttggctcag atggaaacag cttggaggag gcatttgctc cctgaaccaa 60
 cccccagggc tgccccggag accgcacttc agaagcacgc gcgtgaaacg gagtccaaca 120
 taacaga 127

<210> 12
 <211> 571
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gctagaatct accagtaagc catctgattt cccagtaagc catcctgggc tttctcttgt 60
 tgaaagcttt ttgattgctg attttcattt tcttcatttg ttgtttgtct gttcaggctt 120
 tgtatttctt cttgattcag gtctttgtaa gttgtacatt tctgggatat ttccatttct 180
 tctaggttgt ccaccttggt tgcataataat tgttcatact agcccccttct gatccccctt 240
 atttctatgc cctctgttgt aagggtgtct ttctcatttc tgactgtatt tatttgtatc 300
 ttcttccttt tcttaaaagg ttgttgatt ttgtttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
 ctttcaatga ttttttttcc cattgttttt caactctctt ttttaaaaaa gtattttgct 420
 cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac 480
 aaggctcttt caaaagctcc tatagggat acaaaatttc cccatctctt tataccagaa 540
 aacaaagtta tttacaattc atcttaagtc t 571

<210> 13
 <211> 271
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 acctggctaa tttttgtatt tttagtagac acgggggttc accatgttgg ccaggctggg 60
 ctggaactcc tgacctcagg tgatttgctt gcctcggcct cccaagtgtt gggattacag 120
 gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcaggttt tcttaattgc agagcttagt gtggtatact 180
 ttctgaaggc atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgtcatagt 240
 ccaccagcta tgatctgctt aaaacagctg c 271

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

ctgcctttct ccaccagaga ctcttcctca gggag

35

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gctcaatgaa atccttcctt cctgtccaca ccacgtgct tatcag

46

<210> 16

<211> 255

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gtaccggtgg gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatgggc 60

ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtgatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct 120

ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attgaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180

ctgctgggaa agagttaaca atgaatgttt tgttcattaa aatgtgttct cagcaatctc 240

aaaaaaaaaaaa 255

<210> 17

<211> 128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tcagggtttc ttaattgcag agcttagtgt ggtatacttt ctgaaggat ctaacaggga -- 60

ataggggcaa acaaatagct gcatgctcct gtcatagtcc accagctatg atctgcttaa 120

aacagctg 128

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.